

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-21565

(P2001-21565A)

(43)公開日 平成13年1月26日(2001.1.26)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
G 0 1 N 33/543  
5 9 5  
5 0 1  
21/64  
33/553

識別記号

F I  
G 0 1 N 33/543  
5 9 5  
5 0 1 P  
21/64  
33/553

テーボード(参考)

5 9 5 2 G 0 4 3

G

審査請求 有 求査項の数2 O L (全6頁)

(21)出願番号 特願平11-193536

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(22)出願日 平成11年7月7日(1999.7.7)

(72)発明者 石田 哲人

大阪府箕面市小野原東2-2-21

(74)代理人 100092392

弁理士 小倉 亘

Fターム(参考) 20043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA05

EA01 GA02 CA04 GA08 GB03

GB21 II115 JA01 KA07 KA09

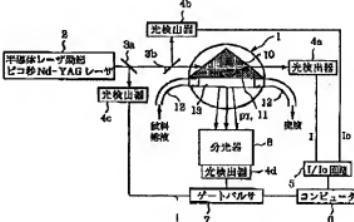
LA01 WA01

(54)【発明の名称】 蛍光免疫分析方法及び装置

## (57)【要約】

【目的】 蛍光ラズモン共鳴を利用して蛍光標識抗体のみを選択的に励起させ、抗原濃度を高感度で測定する。

【構成】 抗体が固定された金属薄膜1をもつ三角形ガラスプリズム10を回転テーブル1に載置し、抗原を含む試料溶液をフローセル13に注入して金属薄膜1側に供給し、抗原を抗体に結合させる。更に、蛍光標識抗体を含む蛍光標識試薬を供給し、抗原に結合している抗体に蛍光標識抗体を結合させる。次いで、蛍光標識抗体が通常吸収する光及び蛍光の整数倍の波長をもつ光を三角形ガラスプリズム10のプリズム側から同時に射入させて、蛍光標識抗体を二光子励起又は多光子励起させ、反射率が最も小さくなる入射角で三角形ガラスプリズムのプリズム側に入射したときに発生する蛍光をスペクトル分析する。



(2)

特許 2001-21565

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体が固定された金属薄膜をもつ三角形ガラスプリズムを回転テーブルに載置し、抗原を含む試料溶液を三角形ガラスプリズムの金属薄膜側に供給して抗原を抗体に結合させ、更に蛍光標識抗体を含む蛍光標識試薬を供給して抗原に結合している抗体に蛍光標識抗体を結合させた後、蛍光標識抗体が通常吸収する光の整数倍の波長をもつ光を三角形ガラスプリズムのプリズム側から入射させて蛍光標識抗体を二光子励起又は多光子励起させ、反射率が最も小さくなる入射角で三角形ガラスプリズムのプリズム側に入射したときに発生する蛍光をスペクトル分析することを特徴とする蛍光免疫分析方法。

【請求項2】 抗体が固定された金属薄膜を一面にもつ三角形ガラスプリズムと、該三角形ガラスプリズムが載置される回転テーブルと、抗原を含む試料溶液及び該抗原に対する蛍光標識抗体を含む蛍光標識試薬を前記金属薄膜側に供給するフローセルと、蛍光標識抗体が通常吸収する光の整数倍の波長をもつ光を三角形ガラスプリズムのプリズム側から入射させる励起光源と、前記抗体に結合した抗原に更に結合した蛍光標識抗体が二光子励起又は多光子励起されたときに発する蛍光を分光分析する光検出器とを備え、反射率が最も小さくなる入射角で三角形ガラスプリズムのプリズム側に入射したときに発生する蛍光をスペクトル分析することを特徴とする蛍光免疫分析装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【產業上の利用分野】 本発明は、プラスモン共鳴による二光子又はそれ以上の多光子励起を利用して抗原濃度を定量する蛍光免疫分析方法及び装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 免疫分析では、ある抗原に対して特異的に結合する抗体を用い、試料内に存在しているごく微量の抗原を高感度で分析している。従来から種々の免疫分析法が知られているが、なかでも分析時間が短く高感度で且つ廃液処理の困難な放射性物質を使用しない蛍光免疫分析法が注目されている。蛍光免疫分析法では、蛍光試薬を標識した抗体を用い、通常の光照射で溶液試料中の抗原と結合した抗体が発する蛍光強度を測定し、測定値から抗原濃度を定量している。

【0003】 また、簡便性や安定性に有利な表面プラスモン共鳴を利用する免疫分析法も採用されている。表面プラスモン共鳴は、金属薄膜を蒸着した三角形ガラスプリズムに光を入射させると、共鳴角  $\theta_0$  で反射光強度が著しく低下する現象である。共鳴角  $\theta_0$  は、金属薄膜の表面に予め結合・固定化した抗体が溶液試料中の抗原に結合することにより変化する。そこで、反射光強度が極小になったときの共鳴角  $\theta_0$  を測定することにより、抗体と抗原との結合割合、ひいては抗原を分析する。蛍光

免疫分析法及び表面プラスモン共鳴を利用した免疫分析法は、このような長所を活用して生化学分析、臨床分析等の分野に応用されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従来の蛍光免疫分析では、抗原と結合した蛍光標識抗体を励起する励起光により、系内に存在する血清蛋白、酵素等の妨害物質が同時に励起される。励起された妨害物質は、強い背景光を発する蛍光発生源となり、測定感度を低下させる。妨害物質の励起に起因する誤差要因は、蛍光標識試薬と妨害物質の偏光性の差を利用する方法、妨害物質に比較して蛍光寿命が長い希土類系標識系抗体を用いる時間分解蛍光分析法である程度解消される。しかし、感度の向上はすでに限界に達しており、新規な蛍光標識試薬の開発による感度の向上が困難な現状である。

【0005】 そこで、既存の蛍光標識試薬を用いながら更なる高感度分析を可能にする分光技術として、二光子励起が考えられている ("p-Bis(o-methylstyril)benzeno as a Power-Squared Sensor for Two-Photon Absorption on Measurements between 537 and 694nm", S.M.Kennedy and F.L. Lytle Anal. Chem., 1986, 58 2643-2647

,"Two-Photon induced fluorescence of biological markers based on optical fibers" A.Lago, A.T.Obedat, A.I.Kaplan, J.B.Khurgin, and P.L.Shkolnikov, Opt. Lett., 1995, 20, 2054-2056等参照)。通常の一光子励起では、蛍光標識試薬の電子の遷移エネルギーに対応する波長の光子を蛍光標識試薬が吸収することにより励起状態を生起させる。他方、二光子励起では、蛍光標識試薬が通常吸収する光の倍の波長をもつ二つの低エネルギー光子を同時に吸収することにより一光子励起と同じ励起状態が生成する。したがって、励起光の電場が強く、局在化している個所が選択的に励起されるため、妨害物質に起因する背景光の影響を大幅に低下させることができになる。しかし、二光子励起の吸収断面積は、一光子励起に比較して数十倍も小さい。その結果、蛍光標識試薬を直接光照射して励起させる上では、極めて高価な超短パルス光源の使用を余儀なくされる。そこで、二光子励起の効率を格段に向上させ、蛍光免疫分析への応用を可能にする手法が求められている。

【0006】 【課題を解決するための手段】 本発明は、このような要求に応えるべく開発されたものであり、表面プラスモン共鳴の電場増強効果及び電場局在化効果を利用して二光子励起の確立を高くすることにより、励起効率を飛躍的に向上させ、妨害物質に起因する背景光の影響を抑制し、抗原濃度を高感度で定量することを目的とする。

【0007】 本発明の蛍光免疫分析方法は、その目的を達成するため、抗体が固定された金属薄膜をもつ三角形ガラスプリズムを回転テーブルに載置し、抗原を含む試料溶液を三角形ガラスプリズムの金属薄膜側に供給して

20 Measurements between 537 and 694nm", S.M.Kennedy and F.L. Lytle Anal. Chem., 1986, 58 2643-2647  
,"Two-Photon induced fluorescence of biological markers based on optical fibers" A.Lago, A.T.Obedat, A.I.Kaplan, J.B.Khurgin, and P.L.Shkolnikov, Opt. Lett., 1995, 20, 2054-2056等参照)。通常の一光子励起では、蛍光標識試薬の電子の遷移エネルギーに対応する波長の光子を蛍光標識試薬が吸収することにより励起状態を生起させる。他方、二光子励起では、蛍光標識試薬が通常吸収する光の倍の波長をもつ二つの低エネルギー光子を同時に吸収することにより一光子励起と同じ励起状態が生成する。したがって、励起光の電場が強く、局在化している個所が選択的に励起されるため、妨害物質に起因する背景光の影響を大幅に低下させることができになる。しかし、二光子励起の吸収断面積は、一光子励起に比較して数十倍も小さい。その結果、蛍光標識試薬を直接光照射して励起させる上では、極めて高価な超短パルス光源の使用を余儀なくされる。そこで、二光子励起の効率を格段に向上させ、蛍光免疫分析への応用を可能にする手法が求められている。

40 【0006】 【課題を解決するための手段】 本発明は、このような要求に応えるべく開発されたものであり、表面プラスモン共鳴の電場増強効果及び電場局在化効果を利用して二光子励起の確立を高くすることにより、励起効率を飛躍的に向上させ、妨害物質に起因する背景光の影響を抑制し、抗原濃度を高感度で定量することを目的とする。

【0007】 本発明の蛍光免疫分析方法は、その目的を達成するため、抗体が固定された金属薄膜をもつ三角形ガラスプリズムを回転テーブルに載置し、抗原を含む試料溶液を三角形ガラスプリズムの金属薄膜側に供給して

(3)

3

抗原を抗体に結合させ、更に蛍光標識抗体を含む蛍光標識試薬を供給して抗原に結合している抗体に蛍光標識抗体を結合させた後、蛍光標識抗体が通常吸収する光の整数倍の波長をもつ光を三角形ガラスプリズムのプリズム側から同時に入射させて蛍光標識抗体を二光子励起又は多光子励起させ、反射率が最も小さくなる入射角で三角形ガラスプリズムのプリズム側に入射したときに発生する蛍光をスペクトル分析することを特徴とする。

【0008】この方法で使用する装置は、抗体が固定された金属薄膜を一面にもつ三角形ガラスプリズムと、該三角形ガラスプリズムが載置される回転テーブルと、抗原を含む試料溶液及び該抗原に対する蛍光標識抗体を含む蛍光標識試薬を前記金属薄膜間に供給するフローセルと、蛍光標識抗体が通常吸収する光の整数倍の波長をもつ光を三角形ガラスプリズムのプリズム側から同時に入射させる励起光源と、前記抗体に結合した抗原に更に結合した蛍光標識抗体が二光子励起又は多光子励起されたときに発する蛍光を分光分析する光検出器とを備えている。

【0009】

【作用】表面プラズモンは、A u、A g、C u、P t、N i、A l等の金属薄膜を蒸着した三角形ガラスプリズムに、プリズム側から所定の共鳴角 $\theta_0$ で光を入射するとき金属薄膜表面に形成される高い反射電場である。共鳴角 $\theta_0$ 付近では、入射光のほとんどが表面プラズモンに変換される。表面プラズモンの電場が入射光とほぼ同様な性質をもつため、電場中に置かれた蛍光標識試薬は、直接受光の吸収で励起する従来法と同様に励起され、蛍光を発する。表面プラズモンによる励起は、電場増強効果を発することが最大の特徴である。すなわち、表面プラズモンの電場強度が入射光の電場強度よりも増強され、特に近赤外領域では数百倍に達する。この電場増強効果により、光を表面プラズモンに一旦変換すると、同様の光源を用いた直接光励起に比較して極めて高い電場強度が得られ、従来の直接光励起では困難であった二光子励起が可能になる。

【0010】しかも、表面プラズモンの電場は、金属表面に強く局在しており、金属表面からの距離に応じて指數関数的に減衰する。この強度分布のため、金属表面以外に存在する妨害物質が励起されず、誤差要因となる背景光が排除される。したがって、表面プラズモン共鳴を蛍光免疫分析に応用すると、金属表面に吸着固定されている蛍光標識抗体のみが選択的に且つ高効率で励起され、妨害物質の影響が最少限に抑制される。更に、表面プラズモンの電場がp-偏光としての特性をもつことから、蛍光の偏光特性の差を利用して背景光を低減することも可能である。このように、表面プラズモンは、蛍光免疫分析用の励起源として理想的な長所をもつ。しかも、電場増強効果及び電場局在効果を組み合わせる

特開2001-21565

4

とき、一層大きな効果が得られる。すなわち、二光子励起の吸収断面積は $10^{-20} \text{ cm}^2$ ~ $10^{-21} \text{ cm}^2$ と極端に小さいため、超短パルスレーザ等による極めて高強度の励起光を照射しなければ通常励起できない。他方、たとえば近赤外光領域における表面プラズモン共鳴により誘導される電場の強度は入射光の数百倍に達する。このような電場強度が吸収断面積に重畳されると二桁以上も大きな遷移確率での励起が可能になり、妨害物質に起因する背景光の影響が排除される二光子又は多光子励起の長所が發揮される。抗体の励起には二光子励起が最も好ましいが、三光子励起による多光子励起によっても同様に背景光を低減し高感度で蛍光を検出することができる。三光子以下の励起においては、二光子励起よりも更に長波長の光を用いて励起する。通常の直接光照射では、二光子励起に比較して吸収断面積が更に小さくなるため励起が極めて困難である。ここに、光源の波長が長波長化するほど電場強度が大きくなる表面プラズモン共鳴を加えると、二光子励起よりも更に大きな遷移確率の増大効果が得られる。

【0011】

【実施の形態】本発明に従った蛍光免疫分析装置は、たとえば図1に示すように三角形ガラスプリズム10を回転テーブル1に載置している。三角形ガラスプリズム10の一面には抗体を固定化した金属薄膜11が設けられており、試料溶液が金属薄膜11に接触しながら流れるようにフローパイプ12及びフローセル13で流路を構成する。フローパイプ12に替えて固定セルを使用することも勿論可能である。金属薄膜11は、三角形ガラスプリズム10の一面に直接形成し、或いは金属薄膜11を形成したガラス基板17(図3)を三角形ガラスプリズム10に貼り合せることにより設けられる。金属薄膜11が設けられる三角形ガラスプリズム10又はガラス基板17としては、近紫外線又は近赤外線の透過率が高い高屈折率である限り材質に制約を受けるものではなく、光学用ガラスB K-7、La SF-N 30、SF-10(ドイツSchott社製)等が使用される。金属薄膜11としては、A u、A g、C u、P t、N i、A l等が使用可能である。

【0012】フローパイプ12及びフローセル13には、試料溶液と反応せず透明度の高いアクリル樹脂が好適に使用される。フローパイプ12は、図2に示すようにフローセル13に挿し込まれ、同質の三角形ガラスプリズム10とガラス板14との間に挟持され、樹脂接着剤を用いて全体が接着Pされる。フローパイプ12は一部が開放されており、試料溶液が金属薄膜11に接する接液部15となる。励起光源2としては、図1では二光子発生源として半導体レーザ誘起ビコ秒N d-Y A Gレーザ(波長532 nm、パルス幅800皮秒、エネルギー1 μJ)を示しているが、これに拘束されることなく、対象となる蛍光標識試薬に応じた波長をもつレーザ

50

が適宜選択される。

【0013】励起光源2から出射されたレーザ光は、ビームスプリッタ3aで透過光及び反射光に分割される。透過光は、更にビームスプリッタ3bで透過光及び反射光に分割され、透過光が三角形ガラスプリズム10のプリズム面に導かれる。プリズム側から三角形ガラスプリズム10に入射した透過光は、屈折して金属薄膜11に投影され、金属薄膜11で反射した後、三角形ガラスプリズム10の他のプリズム面から出射される。三角形ガラスプリズム10に対する入射角は、回転テーブル1の回転角度を調整することにより設定、変更される。

【0014】三角形ガラスプリズム10から出射された光を光検出器4aで検出し、反射光強度Iを測定する。また、ビームスプリッタ3bで分割された反射光を光検出器4bで検出し、入射光強度I<sub>0</sub>を測定する。反射光強度I及び入射光強度I<sub>0</sub>は、それぞれ光検出器4a及び光検出器4bからI<sub>0</sub>/I<sub>0</sub>回路5に出力される。I<sub>0</sub>/I<sub>0</sub>回路5で反射率I/I<sub>0</sub>が求められ、コンピュータ6にに出力され記録される。三角形ガラスプリズム10を回転させた回転テーブル1を回転させながら反射率I/I<sub>0</sub>の測定するとき、反射率I/I<sub>0</sub>が最小になる入射角、すなはち共鳴角θ<sub>0</sub>が求められる。

【0015】ビームスプリッタ3aからの反射光は、光検出器4cに入力され、光検出器4dのゲート開閉に利用される。光検出器4a～4cには、たとえばPINフォトダイオードが使用される。光検出器4dには、たとえばイメージを増強する機能をもつゲート付きCCD分光検出器が使用される。企画薄膜11に固定されている抗体は、フローバイプ12から注入された試料溶液中の抗原と結合する。抗体に結合した抗原に更に蛍光標識抗体を結合させる。蛍光標識抗体は、三角形ガラスプリズム10に入射した光で励起され、蛍光FLを発する。

【0016】蛍光標識抗体を含む試薬としては、近紫外又は近赤外に吸収をもつ限り多数の有機蛍光標識試薬やヒト類型蛍光標識試薬が使用される。ヒト類型蛍光標識試薬には、Eu<sup>2+</sup>、Tb<sup>3+</sup>、Yb<sup>3+</sup>、Sm<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>、Nd<sup>3+</sup>、Er<sup>3+</sup>、Ho<sup>3+</sup>、Pr<sup>3+</sup>、Cd<sup>2+</sup>等のヒト類型イオンを含む試薬がある。発光寿命の短い通常の有機系蛍光標識試薬を使用する場合、レーザ照射直後に光検出器4dのゲートを開けて蛍光FLを検出するように、光検出器4cからゲートバルサ7に検出信号を送り、ゲートバルサ7から光検出器4dにゲート開閉信号を出力する。これにより、金属薄膜11から発せられた蛍光FLが分光器8を透過して光検出器4dで検出される。発せた蛍光FLは、抗体の選択励起によるものであり、二光子励起により背景光が抑えられている。蛍光寿命が極めて長いヒト類型標識試薬を使用する場合、数百ナノ秒が経過した後で光検出器4dのゲートを開き、金属薄膜11からの蛍光FLを検出する。ゲート開放のタイミングをこのように調整するとき、妨害物質に起因する背景光が大幅に低下し、蛍光FL

が一層高感度で測定される。

【0017】

【実施例】抗体が固定された金属薄膜11を次の手順でガラス基板17上に設けた。図3に示すように、ガラス基板17上にAuを蒸着して金属薄膜11を形成した後、γ-アミノプロピルトリエキシシランの2%アセトン溶液に浸漬し、メタノール及び蒸留水で洗浄した。次いで、グルタルアルデヒドの5%水溶液にガラス基板17を3時間浸漬し、蒸留水で洗浄することにより、抗体固定用の有機層21を金属薄膜11の上に形成した。次いで、血清中の代表的な腫瘍マーカーであるα-fetoprotein(AFP)に対する抗体を含む磷酸緩衝液にガラス基板17を1.6時間浸漬し、抗AFP抗体22を有機層21に結合させた。更に、抗AFP抗体22が関与しない非特異的な吸着を防止するため、有機層21の活性部位位1、1-Mエタノールアミン水溶液及び血清アルブミン溶液でブロッキングした。

【0018】ブロッキング層23の形成後、ガラス基板17にアクリル樹脂製のフローセル13を粘着性パッキングで接接着し、回転テーブル1上の三角形ガラスプリズム10にガラス基板17のガラス側をマッチングオイルで接着した。3.00 μg/m<sup>2</sup>のAFPを含むリン酸緩衝液をフローセル13に注入し、抗AFP抗体22と接触する状態で2時間放置した後、リン酸緩衝液で洗浄し、ガラス基板17上の抗AFP抗体22にAFP24を結合させた。次いで、蛍光標識抗体として代表的な希土類型蛍光標識試薬であるN<sup>3</sup>-isothiocyanato(benzyl)diethylenetriamine-N<sup>1</sup>、N<sup>1</sup>、N<sup>1</sup>、N<sup>1</sup>-tetraacetic acid europium(DTTA-Eu)を1.00 μg/m<sup>2</sup>含む磷酸緩衝液をフローセル13に注入し、AFP24と接触する状態で2時間放置した後、リン酸緩衝液で洗浄した。これにより、ガラス基板17上の抗AFP抗体22で固定されたAFP24にDTTA-Eu25を結合させた。

【0019】以上の操作によって、試料溶液に含まれるAFP24(抗原)の濃度に比例した量のDTTA-Eu25(蛍光標識抗体)がガラス基板17に固定された。 AFP24(抗原)及びDTTA-Eu25(蛍光標識抗体)が固定されたガラス基板17を備えた三角形ガラスプリズム10を回転テーブル1上で回転させながら、半導体レーザ励起Nd-YAGレーザ(励起光源2)を用いて波長532 nmのp-偏光をプリズム側から照射し、各入射角ごとに反射率を測定した。その結果、入射角がほぼ7.5度のときに反射率が最少になった。

【0020】反射率が最少になる条件下で発光スペクトルを測定したところ、図4に示すように3価ユロビウムイオンに特徴的な発光スペクトルが観察された。更に、種々のAFP濃度を有する試料溶液を用いて検量線を作成し定量したところ、AFP濃度と発光強度との間

(5)

特問2001-21565

8

に密接な直線関係が成立していることが判った。このことから、本発明によるとき、抗原の濃度を十分に定量できることが確認された。

[0021]

【発明の効果】以上に説明したように、本発明においては、表面プラズモン共鳴を利用して蛍光標識抗体を二光子励起又是多光子励起させ、このときに発生する蛍光をスペクトル分析することにより、金属薄膜に固定した抗体に結合している抗原を定量している。この方法によるとき、試料溶液に含まれている妨害物質が励起されず、吸着固定されている蛍光標識抗体のみを選択的に且つ効率よく励起させることができため、抗原濃度を高精度で評価できる。

### 【画面の簡単な説明】

【図1】 表面プラズモン共鳴を利用した蛍光免疫分析装置の概略図

【図2】 抗体を固定した金属薄膜が設けられた三角形\*

\*ガラスプリズト及びフローネルを示す図

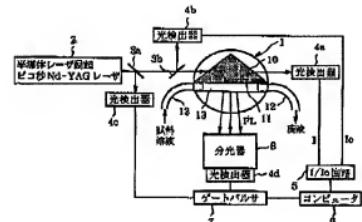
【図3】抗体を金属薄膜に固定するプロセス及び抗体に結合した抗原の濃度を測定するプロセスの説明図

【図4】 実施例で求められた表面プラスモン励起による希土類標識抗体の蛍光スペクトル  
【第1回の説明】

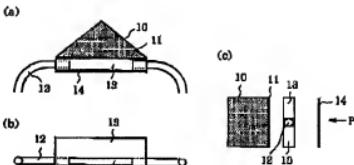
【符号の説明】  
 1：回転テーブル 2：励起光源 3 a, 3 b：ビームスプリッタ 4 a～4 d：光検出器 5：I/L回路 6：コンピュータ 7：ゲートバルサ

8: 分光器  
 10: 三角形ガラスプリズム 11: 金属薄膜 1  
 2: フローパイプ 13: フローセル 14: ガラス板 15: 接液部 17: ガラス基板  
 21: 有機層 22: 抗 AFP 抗体 23: プロテーキング層 24: AFP (α-フェトプロテイン: 抗原) 25: DTTA-A-Eu (光漂標識抗体)  
 1: 反応光路強度 1a: 1st 反応光路強度 1f: 1st 光路強度

【图1】

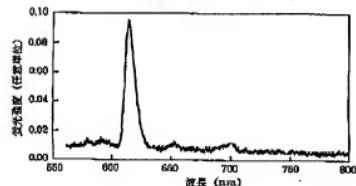


【图2】



【图4】

### 希土類桿菌抗体の発光スペクトル



(6)

特開2001-21565

【図3】

